

Sulbactam の各種 β -lactamase 不活化作用と ペニシリン結合蛋白に対する親和性

横田 健・関口 玲子・東 映子・鈴木 映子
順天堂大学医学部細菌学教室

Sulbactam(SBT)等の β -lactamase inhibitorの作用機序を検討した結果、耐性菌に対し β -lactam 抗生物質と協力作効が強い薬剤は、酵素に対する不可逆的不活化力を持つものであり、一時阻害力の強弱は影響が少ないことがわかった。SBTは、Ic, II, III(TEM)およびV(OXA)型 β -lactamaseを強く、Ia型 β -lactamaseを軽度の不活化するので、広域第三世代cephemの一つであるCefoperazoneと組み合わせると、*P. vulgaris*, *P. cepacia*, *B. fragilis*, R因子を持った*E. coli*, *Klebsiella*, *P. mirabilis*等に協力的抗菌力が認められる。しかしIII(TEM)型酵素に対する不活化力は、clavulanic acid(CVA)より弱い。またIc型 β -lactamaseを染色体性に産生する*Serratia*等に対しても、CPZとある程度の協力作効が認められる。

SBTは25 μ g/ml以上において*E. coli*のPBPを1a, 3, 2の順序におさえ、CPZと組み合わせると溶菌濃度が著明に低下した。

各種病原菌において β -lactam抗生物質耐性臨床分離株の主たる耐性機構は、 β -lactamaseであることが知られているので、その対策として、 β -lactamaseに安定な新誘導体を開発するほか、いわゆる β -lactamase inhibitorを既存の薬剤と組み合わせる方法が考えられる。すでにCloxacillin(MCIPC)とAmpicillin(ABPC)の合剤が実用化されているが、それは期待されたほどの力を耐性菌に示さない。

1977年、英国のREADINGとCOLE¹⁾は、放線菌代謝産物からCVAを発見し、これがABPC等と強い協力作効を耐性菌に示すことを明らかにし、Amoxicillin(AMPC)との内服用合剤が開発されつつある。しかしCVAは不安定なためK塩として安定化されており、副作用の点から注射剤としての開発は容易ではない。

1978年、米国のENGLISHらはpenicillanic acid sulfoneであるSulbactam(SBT)を有機合成した。この物質は耐性菌に β -lactam薬剤と協力作効を示すほか、安定性および安全性にすぐれるので注射用 β -lactam抗生物質と組み合わせ耐性菌用薬剤の開発が可能である。本研究においては、これらの各種 β -lactamaseに対する影響を調べ、協力作効がみられるためには、酵素に対する一時的阻害力が重要なのか、永久的不活化力が重要なのかを検討した。

I. 材料および方法

1. 薬剤

SBT, CVA, MCIPC, およびN-formimidoyl thienamycin(MK-0787)はそれぞれ、台糖ファイザー、Beecham薬品、藤沢薬品および日本MSDから供与された。

2. 被検菌株

代表的なIa, Ic, IIb, III(TEM), IVbおよびV(OXA)型 β -lactamase産生菌として、*E. cloacae* NeK 39, *P. vulgaris* 33, *P. mirabilis* JY 10, *E. coli* CSH2(RK1), *Klebsiella* 42および*E. coli* CSH2(RE45)を使用した。またペニシリン結合蛋白(PBP)の研究には、*E. coli* NIHJ JC-2および*S. aureus* NIHJ JC-1(209P)を使用した。

3. β -lactamase inhibitorの一時阻害力の検討

β -lactamase inhibitorの各型酵素に対する一時的阻害力は K_i 値で比較した。すなわち各型酵素を産生する菌の対数増殖期後期の細胞を集め、超音波破碎と超遠心により調製した粗酵素に、基質として種々の濃度のABPC(PCaseに)またはCephaloridine(CER)(CEPaseに)を加えさらに阻害剤をいろいろな濃度に添加して、基質の加水分解初速度の変化を指示薬を使った酸測定法²⁾で検討した。 K_i 値は以上の成績をもととして、Dixon plotで求めた³⁾。

4. β -lactamase inhibitorの不可逆的不活化力の測定

各型 β -lactamase inhibitorの不可逆的不活化(永

久不活化)の程度はFISHER⁴⁾による希釈法と, MATTHEW⁵⁾⁶⁾による等電点電気泳動法で検討した。希釈法は約100単位/0.1mlの β -lactamase希釈液と0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に1~10 μ g/0.1mlになるように溶かした阻害剤をマイクロチューブ中で混合し, 30 $^{\circ}$ C 50分間保温した後基質溶液(1a, 1c型にはCER, その他のPCase型にはABPC)で200倍にうすめ, さらに30 $^{\circ}$ C 30分間反応させた後, 残存酵素活性で破壊させた基質量を, Macroiodide法で測定した。 β -lactamaseの残存活性はinhibitorで処理する前のそれを100とした時の比較値で表示した。

等電点電気泳動は, acrylamid 9.7%, bisacrylamid 0.3%, amberite MB-1 1%の原液15mlに pharma-lite 1.9ml, glycerine 4ml および蒸留水 9mlを加え攪拌後, 15分以内に真空脱気し22.8mg/mlのammonium persulfate 0.3mlを加え, 注射器でゲル支持板上に流して固めた。泳動槽の陽極には0.04M (DL) asparagic acidを, 陰極には1M NaOH溶液を入れ, 30W 30分間予備泳動を行う。新しい電極ストリップと置き換えた後, 予想される被検 β -lactamaseの等電点が酸性側にある場合には陰極に, アルカリ側の時は陽極に近い位置に1,000~7,000 unit/mlの β -lactamaseを含む粗酵素液5~10 μ lをゲル上に滴下する。20分間に室温に放置して試料を浸みこませ, 30W 1時間一定電力で泳動を行った。泳動後ただちに, 0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶かした色素原性CEP (Glaxo 87/312)を噴霧し, 残存 β -lactamase活性によって発色する赤紫のスポットをポラロイドカメラで撮影した。

5. *E. coli* および *S. aureus* のPBPに対する SBT

の親和性

SBTのPBPに対する親和性はSPRATT⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち被検菌の膜画分を調製し, それに種々の濃度のSBT等を加え, 30 $^{\circ}$ C 10分間前処理後, さらに¹⁴C-benzyl penicillin (¹⁴C-PCG)を加え, sarkosylで細胞質膜をとかし, 外膜を遠心で除いたうえ, SDSを加えて100 $^{\circ}$ C 2分間加熱して蛋白を解離させ, acrylamide slab電気泳動にかけた。ゲルに増感剤をしみこませた後乾燥し, Kodak X-O matフィルムに密着させ-80 $^{\circ}$ C 4週間露光して現像したものである。 β -lactamase inhibitorに親和性の強い画分は, 後で加えた放射性PCGの結合する余裕がなくなるのでautoradiographyにおけるその画分の放射性バンドはうすくなるか消失する。

6. SBTとCPZの合剤存在下で培養した菌細胞形態変化の観察

E. coli CSH 2 (RE 45) または *P. vulgaris* 33 をMIC前後のCPZ単独またはCPZとSBT合剤存在下で, L-寒天上で培養し2% glutaric aldehydeで固定しethanolで脱水後, iso-amyl acetate置換法で臨界点乾燥を行い, 白金パラジウム蒸着して, 日立走査型電子顕微鏡S-450で観察した。一部の菌については, 培養面から菌をとり2% glutaric aldehydeと2% osmic acidで二重固定後ethanolで脱水し, epoxy樹脂に包埋し超薄切片を作り, uranium acetateと鉛で染色後, 日立透過型電子顕微鏡GEM 100Bで観察した。

II. 成 績

1. 各種 β -lactamase inhibitorの K_i 値の比較 各種 β -lactamase inhibitorの代表的酵素に対する

Table 1 Affinities of β -lactamase-inhibitors to various β -lactamases

β -lactamase			K_i (μ M)				
RICHMOND	MITSUHASHI & YAMAGISHI	Source	SBT	CVA	MCIPC	MFIPC	MK-0787
Ia	CEPase	<i>E. cloacae</i> NeK 39	78.3	496	0.89 $\times 10^{-3}$	0.70 $\times 10^{-3}$	0.14
Ic	CEPase	<i>P. vulgaris</i> 33	1.52	0.53	1.21	0.70	0.16
II		<i>P. mirabilis</i> JY 10	0.41	0.089	45.8	43.5	8.47
III	PCase I	<i>E. coli</i> CSH2 (RK1)	0.69	0.30	20.8	12.7	2.30
IV		<i>Klebsiella</i> 42	0.96	0.26	17.5	8.53	1.38
V	PCase II	<i>E. coli</i> CSH2 (RE45)	32.8	12.5	ND	ND	4.13

K_i 値は Table 1 に示した。

SBT は Ic, II, III および IV 型 β -lactamase を強く一時的に阻害し、Ia (CEPase) および V 型酵素に対する作用は中等度にとどまる。

CVA は SBT に近い一時阻害力のパターンを示すが、Ia 型酵素はほとんど阻害しない。

MCIPC と Flucloxacillin (MFIPC) は Ia 型 β -lactamase (CEPase) にきわめて高い阻害力を示し、ついで Ic 型に強く、II, III, IV 型等 PCase に対する一時阻害力は弱い。

自身でも強い抗菌力を持つ MK-0787 は、各型 β -lactamase に対して平均した一時阻害力を示した。

これらの β -lactamase inhibitor おのおのが持つ β -lactamase 一時阻害力の強弱が、耐性菌に対する β -lactam 抗生物質との協力作用の強弱に反映するかどうか、すべての inhibitor が近似した K_i 値を示す Ic 型 β -lactamase を産生する *P. vulgaris* 33 を使って実験を行った。Fig. 1 に示すとおりこの菌に対し SBT と CVA は CER と強い協力的抗菌力を示すが、それと K_i 値があまり変わらない MCIPC と MFIPC とは、CER との協力作用がほとんど認められない。以上の結果は、 β -lacta-

mase inhibitor としての有用性には永久阻害力がより重要であることを示している。

2. β -Lactamase inhibitor の永久不活化力と協力作用との関係

一時阻害力が β -lactamase inhibitor の協力作用発現に対し影響が少ないことがわかったので、永久不活化力を検討した。Ic 型 β -lactamase は Fig. 2 に示すとおり希釈法で調べても、Fig. 3 のごとく等電点電気泳動法で検討しても、SBT, CVA, および MK-0787 で強く不活化されるが、MCIPC や MFIPC はどちらの方法でもまったく永久不活化力のないことがわかった。SBT と CVA とは、等電点電気泳動で調べると細かい点で不活化の様相が違い、SBT が Ic 型の 3 つのアイソザイムのうち副画分の 2 つを強くおさえるのに対し、CVA は主画分を強く不活化し、副画分の等電点を変化させた。

SBT と CPZ を組み合わせるとこの Ic 型 β -lactamase を作る *P. vulgaris* の臨床分離 41 株に対し Fig. 4 のごとくきわめてすぐれた協力的抗菌力を示した。

多くの R plasmid が支配する III (TEM) 型 β -lactamase に対しては、Fig. 5 および 6 に示すように SBT の不活化力は CVA におよばない。しかし MFIPC 等がま

Fig. 1 Synergy of β -lactamase-inhibitors with cephaloridine to *P. vulgaris* 33 producing the type Ic β -lactamase (Liquid dilution method)

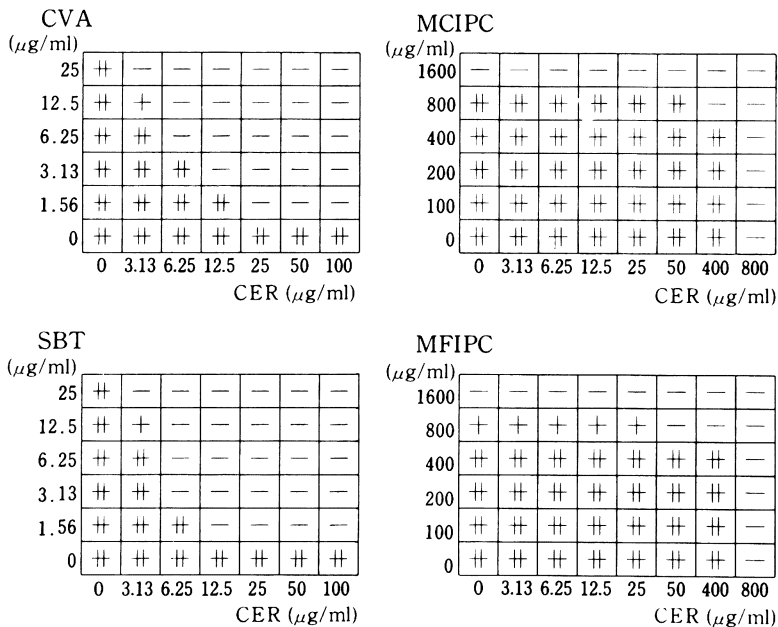


Fig. 2 Permanent inactivation of the type Ic β -lactamase by β -lactamase-inhibitors

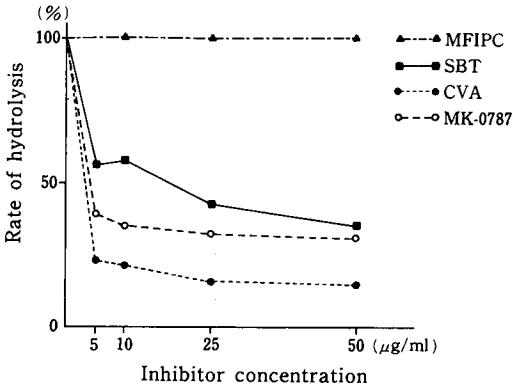


Fig. 3 Isoelectric focusing of the type Ic β -lactamase pretreated with β -lactamase-inhibitors

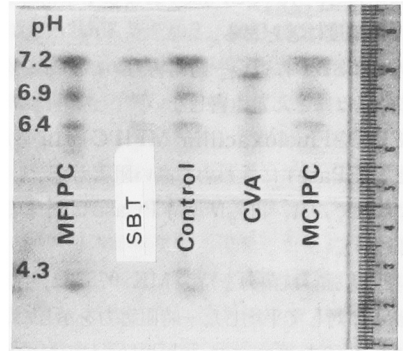


Fig. 4 Cumulative sensitivity of 41 clinical isolates of *P. vulgaris* to CPZ, SBT and their combination

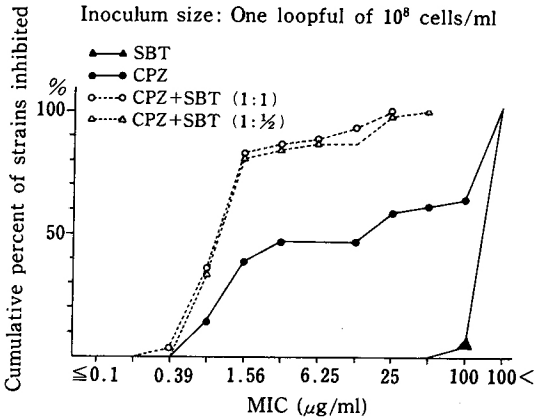


Fig. 5 Permanent inactivation of the TEM-type penicillinase by β -lactamase-inhibitors

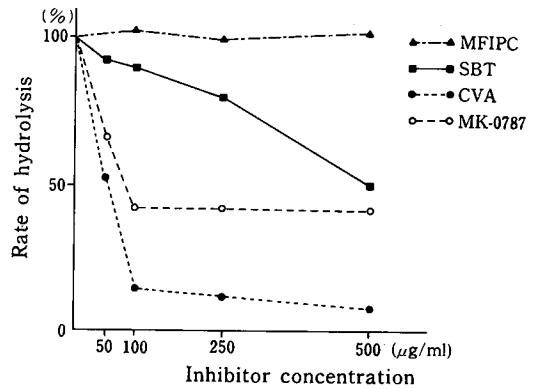
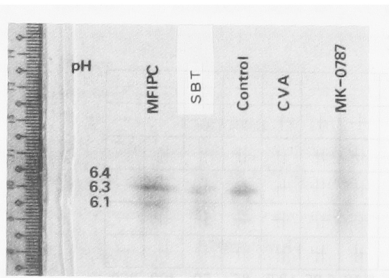


Fig. 6 Isoelectric focusing of the TEM-type penicillinase pretreated with β -lactamase-inhibitors



まったく永久不活化作用がないのに比べると、明らかな差が見られる。この不活化力の差はR因子保有株に対する協力作用の強弱として認められ、Fig. 7, 8および9のごとくR plasmid 保有 *E. coli* に対しては、CVAの協力作用が最も強く、SBTがそれに次ぎ、MFIPCでは協力作用が極めて弱い。

CPZとSBTを組み合わせると、CPZのIII型 β -lactamaseによる加水分解は、ABPCより少ないので、SBTの併用効果がFig. 10のようにさらに顕著に認められる。

SBTは以上の酵素のほかFig. 11および12のごとくIa型とII型 β -lactamaseを強くおさえるので *P. mirabilis* や *Citrobacter* や *Serratia* 等の弱毒グラム陰性桿菌に対してもCPZとの併用効果が高い。またIVおよびV型 β -lactamaseも中等度に不活化するので(Fig. 13, 14),

Fig. 7 Cumulative sensitivity of 53 subclones of *E. coli* carrying various R(bla) plasmids to ABPC, SBT and their combination

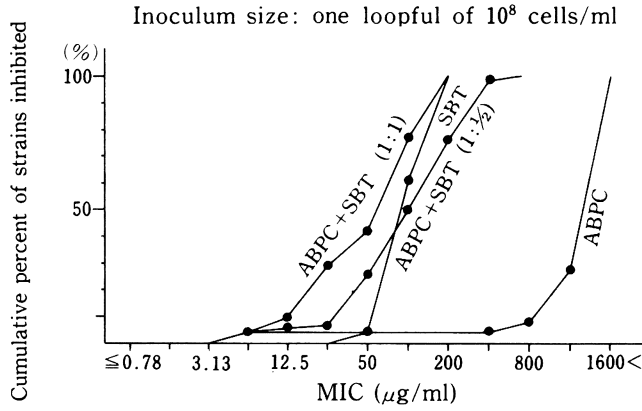


Fig. 8 Cumulative sensitivity of 53 subclones of *E. coli* carrying various R(bla) plasmids ABPC, CVA and their combination

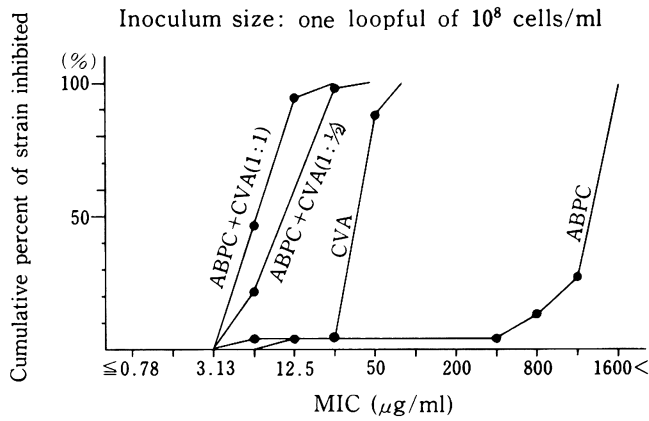


Fig. 9 Cumulative sensitivity of 53 subclones of *E. coli* carrying various R(bla) plasmids to ABPC, MFIPC and their combination

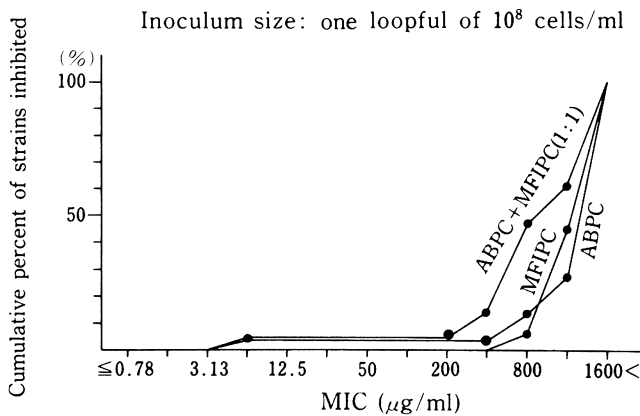


Fig. 10 Cumulative sensitivity of 53 subclones of *E. coli* carrying various R(bla) plasmids to CPZ, SBT and their combination
Inoculum size: one loopful of 10^8 cells/ml

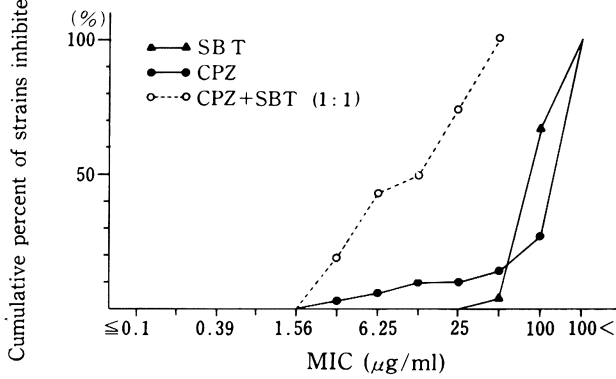


Fig. 11 Permanent inactivation of the type Ia β -lactamase by β -lactamase-inhibitors

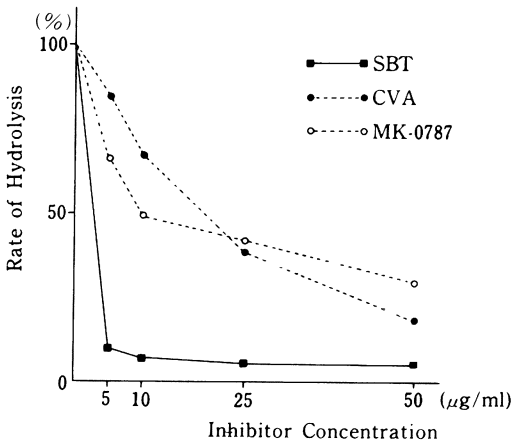


Fig. 12 Permanent inactivation of the type II β -lactamase by β -lactamase-inhibitors

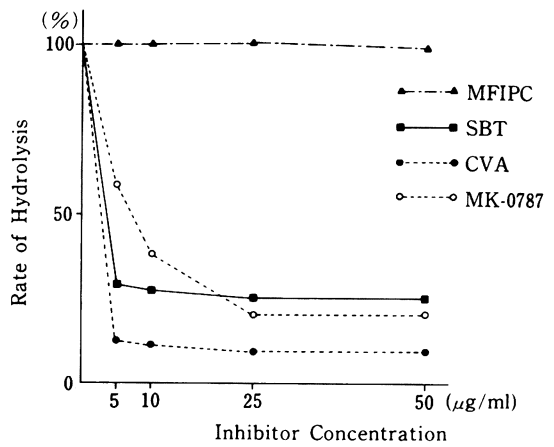


Fig. 13 Permanent inactivation of the type IV β -lactamase by β -lactamase-inhibitors

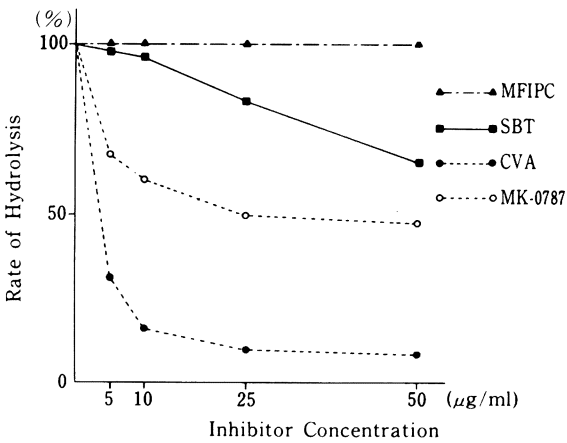
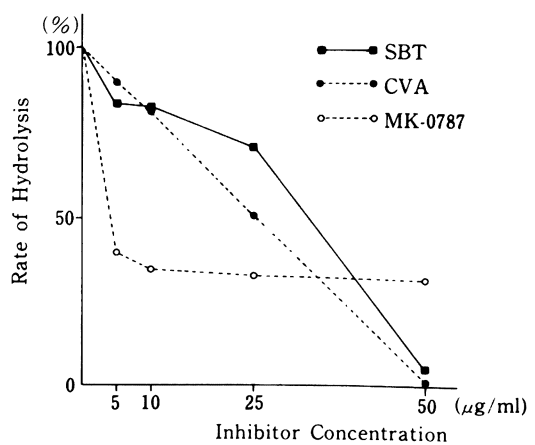


Fig. 14 Permanent inactivation of the type V β -lactamase by β -lactamase-inhibitors



Klebsiella や OXA 型酵素支配の R 因子保有株に対しても、CPZ と併用効果が認められる。

3. SBT の PBP に対する親和性

SBT は自身で *Acinetobacter* や *Neisseria* に強い抗菌力を示すばかりでなく、*S. aureus* や *E. coli* に対してもある程度の抗菌活性を持つ。PBP に対する影響をみると、*S. aureus* では細胞壁合成に必須とされる 2 および 3⁸⁹⁾、*E. coli* でも菌伸長時のムレイン架橋酵素、PBP 1a および 1b を弱いながらおさえるのは Fig. 15 および 16 のとおりである。

4. SBT と CPZ 合剤の *E. coli* および *P. vulgaris* に対する形態変化

SBT は各種 β -lactamase を不活化するほか、作用点にもある程度影響を与えるので、CPZ との合剤は CPZ

単独より溶菌濃度が低い。すなわち Fig. 17 および 18 に示すとおり R plasmid を持つ *E. coli* は CPZ 単独の MIC 濃度の 200 μ g/ml でも、菌細胞の変化は主としてフィラメント化にとどまり溶菌は少ないが、合剤では MIC の 25 μ g/ml 添加でほとんどすべての菌細胞がスフェロプラスト化し溶菌する。

SBT と CPZ の協力的溶菌作用は他菌種でも明らかに見られ、Fig. 19 のとおり *P. vulgaris* は MIC 濃度で溶菌し空胞化したようすが認められた。

III. 考 察

β -lactamase 産生による各種病原菌の β -lactam 抗生物質耐性には、 β -lactamase inhibitor と既存の薬剤との併用がその対策の一つとなる。しかし耐性菌に対し β -lactam 薬剤と協力的抗菌力を示しうる inhibitor は、

Fig. 15 Competition of SBT for penicillin binding proteins of *S. aureus*

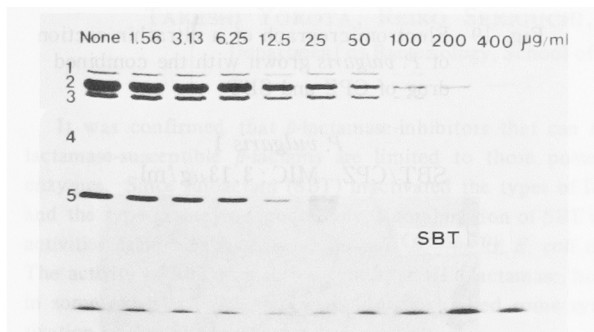


Fig. 16 Competition of SBT and clavulanic acid (CVA) for penicillin binding proteins of *E. coli*

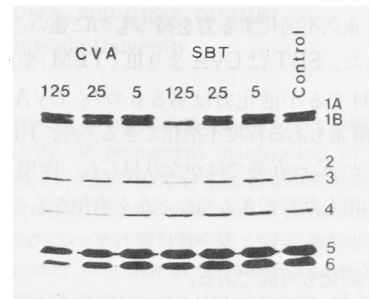


Fig. 17 Scanning electronmicrographs of *E. coli* NIHJ JC-2 carrying an R plasmid and grown with CPZ alone

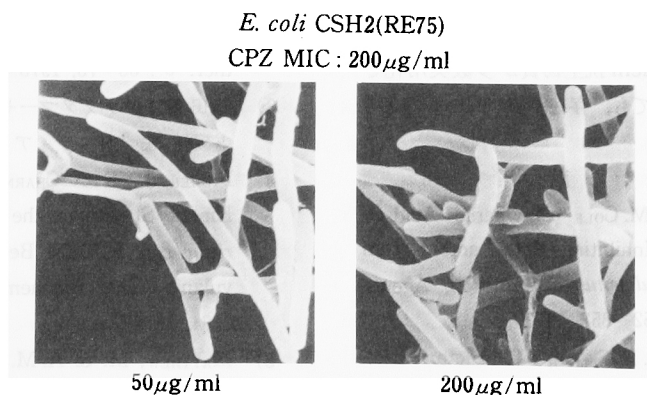
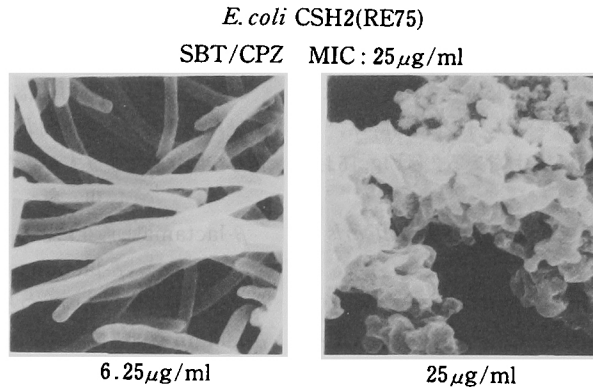


Fig. 18 Scanning electronmicrographs of *E. coli* NIHJJC-2 carrying an R plasmid and grown with the combination of SBT and CPZ



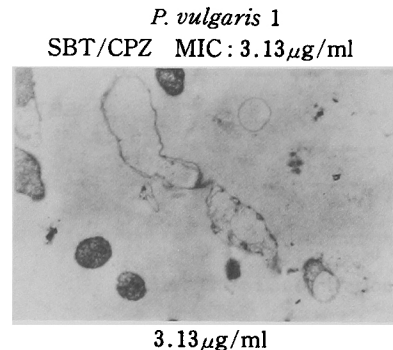
酵素を永久不活化する力を持つものに強いことが明らかになった。SBTはCVAよりIII(TEM)型 β -lactamaseに対する不活化力は劣るものの、CVAの及ばないIa型酵素もある程度不活化できる点や、PBPに対する親和性が*E. coli*等ではかなり見られ、作用点における協力作用も期待できる点などから有用なものと考えられる。しかも安定性と安全性に優れているので、注射剤としての開発も可能である。

CPZにSBTを混合すると、第三世代cephem抗生物質の中では最も広い抗菌域とすぐれた体内動態を示しながら、PCase型 β -lactamaseで若干加水分解されるため少数ながら耐性菌のみられるCPZの欠点が除かれるほか、抗菌域が*Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Pseudomonas cepacia*等にまで拡大する。すなわち合剤の利点は単にCPZの β -lactamaseに対する安定性向上にとどまらず、他の第三世代cephemそれぞれ一剤では望みにくい広域性を獲得することになる。したがって開発中のものを含め新cephem抗生物質が多数実用化されるであろう将来においても、存在価値が高いものと考えられる。

文 献

- 1) READING, C. & M. COLE Clavulanic Acid, a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligenus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 852~857, 1977
- 2) RUBIN, F. A. & D. H. SMITH, : Characterization of R factor Beta-Lactamases by the Acidi-

Fig. 19 Electromicrograph of a ultrathin section of *P. vulgaris* grown with the combined drug of CPZ and SBT



- 2) metric Method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3: 68~73, 1973
- 3) 横田 健: β -ラクタマーゼ測定法とその酵素活性と耐性。モダンメディア 24(7): 360~377, 1978
- 4) FISHER, J.; R. C. CHARNAS & J. R. KNOWLES: Kinetic Studies on the Inactivation of *Escherichia coli* R TEM Beta-Lactamase by Clavulanic Acid. *Biochemistry* 17(11): 2180~2184, 1978
- 5) MATTHEW, M. & A. M. HARRIS: The Use of Analytical Isoelectric Focusing for Detection

- and Identification of Beta Lactamases. J. Gen. Microbiol. 88 : 169~198, 1978
- 6) MATTHEW, M. & A. M. HARRIS : Identification of Beta Lactamases by Analytical Isoelectric Focusing ; Correlation with Bacterial Taxonomy. J. Gen. Microbiol. 94 : 55~67, 1976
- 7) SPRATT, B. G. : Distinct Penicillin Binding Proteins Involved in the Division, Elongation and Shape of *Escherichia coli* K 12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 : 2999~3003, 1975
- 8) NIGEL A. C. CURTIS, M. V. HAYES, A. W. WYKE & J. B. WARD : A Mutant of *Staphylococcus aureus* H Lacking Penicillin-Binding Protein 4 and Transpeptidase Activity *In Vitro*. FEMS Microbiology Letters 9 : 263~266, 1980
- 9) NIGEL A. C. CURTIS & M. V. HAYES : A Mutant of *Staphylococcus aureus* H Deficient in Penicillin-Binding Protein 1 is viable. FEMS Microbiology Letters 10 : 227~229, 1981

SULBACTAM (SBT): PERMANENT INACTIVATION OF VARIOUS TYPES OF β -LACTAMASES AND THE AFFINITY TO PENICILLIN-BINDING PROTEINS IN BACTERIA.

TAKESHI YOKOTA, REIKO SEKIGUCHI, EIKO AZUMA, and EIKO SUZUKI
Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

It was confirmed that β -lactamase-inhibitors that can manifest a synergy of antibacterial activities with β -lactamase-susceptible β -lactams are limited to those possessing an activity of permanent inactivation of the enzymes. Since sulbactam (SBT) inactivated the types of Ic, II, III(TEM), IV, and V(OXA) β -lactamases strongly and the type Ia enzyme moderately, a combination of SBT with cefoperazone (CPZ) showed marked antibacterial activities against *P. vulgaris*, *P. cepacia*, *B. fragilis*, *E. coli* carrying R (*bla*) plasmids, *Klebsiella*, and *P. mirabilis*. The activity of SBT to inactivate the type III β -lactamase, however, was weaker than that of clavulanic acid (CVA) in some extent. The combined drug exhibited some synergies to *Serratia marcescens* also, because of inactivation of the type Ia enzyme.

SBT competed for penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with more than 25 μ g/ml, resulting in stronger cell-lysis if combined with CPZ.